

BAB III

TATA KERJA

3.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam pengujian ini adalah papan bedah beserta alat bedah steril, kandang mencit, masker, sarung tangan, timbangan hewan, timbangan analitik, sonde, spatel, kaca arloji, gelas ukur, gelas beker, batang pengaduk, *Software standar OECD 425 up and down procedure* versi 1.0.

3.2. Bahan

Pada penelitian ini bahan yang digunakan yaitu metil sinamat, mencit, natrium CMC 1%, aquadest, etanol 96%, *Phosphate buffered formalin*, xylen, paraffin, dan pewarna haematoksin-eosin.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Penyiapan Hewan Uji

Hewan percobaan (mencit) diaklimatisasi terlebih dahulu dengan agar mencit dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru dan menghindari efek stres pada mencit yang dapat mempengaruhi hasil (OECD, 2001; Barile, 2008). Aklimatisasi dilakukan selama ± 7 hari sebelum perlakuan. pakan dan air minum (*ad libitum*) diberikan pada hewan uji.

Mencit yang digunakan dalam percobaan ini yaitu mencit yang sehat dengan ciri-ciri mata merah jernih, tidak terjadi piloereksi, bertingkah laku normal, mengalami peningkatan berat badan dalam batas tertentu yang diukur secara rutin. Untuk membedakan masing-masing mencit perlakuan, dilakukan penandaan mencit menggunakan spidol permanen.

Pencahayaan diatur 12 jam terang dan 12 jam gelap serta kondisi ruangan percobaan juga dijaga setiap hari mengikuti aturan OECD (OECD, 2008, 2001).

3.3.2. Persiapan Bahan

1. Pembuatan Larutan Bahan Uji

Sediaan dilarutkan dalam larutan Na-CMC 0,5% dengan dosis yang telah ditentukan sesuai dengan ketentuan dosis dari OECD 425 yaitu 1,75, 5,5, 17,5, 55, 175, 550, 1750, 5000 mg/kg BB.

2. Pembuatan Larutan Na-CMC

Na-CMC dilarutkan didalam aquadest sesuai dosis yang telah ditentukan.

3.3.3. Prosedur Kerja Uji Toksisitas Akut

1. Prosedur Uji

a. Uji Terbatas

Hewan coba dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol negatif dan kelompok bahan uji (isolat metil sinamat) data awal bahan uji yang digunakan pada limit test yaitu 5000 mg/kg bb, dengan data toksisitas akut dari metil sinamat yaitu 2610 mg/kg yang diperoleh dari *Material Safety Data Sheet*. Sebelum di berikan perlakuan, hewan coba dipuasakan selama 12 jam namun tetap diberikan minum. Pemberian dilakukan oral menggunakan sonde oral. Setelah perlakuan mencit dipuasakan selama 4 jam, tanda toksisitas diamati setiap 30 menit pada 4 jam pertama dengan interval waktu 48 jam. Jika mencit ditemukan mati maka dilanjutkan ke uji utama. Namun, jika hewan masih bertahan hidup setelah 48 jam, mencit selanjutnya diberikan dosis dan perlakuan yang sama serta dilakukan pengamatan kembali. Jika, ditemukan 3 hewan yang hidup dari 5 hewan uji, maka pengujian dihentikan. Namun, jika ditemukan 3 hewan uji yang mati lebih dari 5 hewan yang diujikan maka perlu dilakukan uji utama.

b. Uji Utama

Hewan uji dipuasakan selama 12 jam namun tetap diberi minum, hewan uji diberikan bahan uji dengan dosis dari estimasi LD₅₀ yaitu 1,75, 5,5, 17,5, 55, 175, 550, 1750, 5000

mg/kg bb. Pemberian dosis pada hewan uji dengan interval waktu 48 jam, dilakukan pengamatan pada hewan uji selama 14 hari. Jika selama 48 jam hewan masih bertahan hidup maka dosis ditingkatkan dari dosis sebelumnya, apabila hewan uji ditemukan mati atau hampir mati maka dosis diturunkan dari dosis sebelumnya. Uji utama dihentikan hingga uji memenuhi salah satu kriteria:

- 1). 3 hewan berturut-turut bertahan di atas batas dosis,
- 2). 5 pembalikan (*reverse*) terjadi pada setiap 6 hewan yang diuji berturut-turut,
- 3). Sedikitnya terdapat 4 hewan telah mengalami pembalikan pertama.

2. Pengamatan Hewan uji

Hewan yang diamati secara individual pada uji utama selama 30 menit pertama setelah dosis diberikan, secara berkala selama 48 jam (dengan perhatian khusus diberikan selama 4 jam pertama), pengamatan untuk total 14 hari, kecuali jika uji sudah memenuhi salah satu kriteria diatas maka pengamatan dihentikan. Pengamatan harus mencakup perubahan kulit dan bulu, mata dan selaput lendir, dan juga pernapasan, peredaran darah, sistem saraf otonom dan tengah, dan aktivitas somatomotor dan pola perilaku. Perhatian harus diarahkan untuk pengamatan tremor, kejang, air liur, diare, lesu, tidur dan koma. Pembedahan dilakukan untuk melihat pengaruh dari pemberian metil sinamat terhadap organ mencit.

3. Pengambilan Organ

Mencit dibunuh dengan cara dimasukkan ke dalam tabung CO₂. Mencit yang sudah benar-benar mati di keluarkan dari tabung kemudian ditelentangkan pada papan bedah. Kulit perut mencit diangkat menggunakan pinset kemudian digunting. Setelah itu di bedah dengan hati-hati, diambil bagian organ vital yang akan diamati untuk selanjutnya diamati secara makroskopik dan ditimbang.

4. Penimbangan Organ

Organ kemudian segera ditimbang untuk mendapatkan bobot organ dalam tubuh hewan percobaan.

5. Pemeriksaan Histopatologi

Seluruh hewan dinekropsi (termasuk yang mati selama penelitian maupun yang dimatikan). Setiap hewan uji diamati dan dicatat perubahan patologinya. Untuk mendapatkan informasi dilakukan pemeriksaan mikroskopik dari organ yang menunjukkan perubahan patologi hewan yang bertahan hidup selama 24 jam atau lebih setelah pemberian dosis awal.

Setiap organ seperti hati, lambung, dan ginjal segera dimasukkan dalam larutan *phosphate buffered formalin* kemudian dibuat preparat histopatologi kemudian diperiksa di bawah mikroskop.

6. Pengamatan Makroskopik Organ

Pada penelitian ini, organ hati, ginjal dan lambung dilakukan pengamatan secara makroskopik dengan cara organ hati, ginjal, dan lambung basah mencit perlakuan ditimbang dan dibandingkan dengan bobot organ mencit kontrol.

7. Pengamatan Mikroskopik Organ

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan setelah hewan uji mati, untuk mengetahui hubungan yang terjadi antara gejala dengan struktur organ yang terpapar bahan uji. Organ hati, ginjal, dan lambung yang diperiksa secara histologis pada penelitian ini. Preparat histologi dibuat dengan mengiris organ menggunakan mesin pemotong khusus (mikrotom) kemudian diletakkan diatas kaca objek, setelah itu dilakukan prosedur pewarnaan menggunakan hematoksilin-eosin (HE), kemudian ditutup dengan kaca penutup objek dan dilem menggunakan entellan. Preparat diamati di bawah mikroskop dan dilakukan pemotretan.

a. Organ Hati

Organ hati dibuat preparat histologi kemudian diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 400x, diambil 10 lapang

pandang pada tiap preparat histologi hati kemudian diamati kerusakan selnya. Nilai skoring diberikan untuk mengetahui derajat kerusakan yang ditemukan (Andreas dkk, 2015).

Skoring : 0 : sel tampak normal

1 : terjadi hemoragi

2 : terjadi degenerasi lemak

3 : terjadi nekrosis

b. Organ Lambung

Organ lambung dibuat preparat histologi dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x. Diambil 5 lapang pandang di tiap preparat histologi hati untuk mengamati kerusakan selnya. Nilai skoring diberikan untuk mengetahui derajat kerusakan yang ditemukan (Ulfah dkk, 2019).

Skoring : 0 : tidak ada perubahan patologik

1 : deskuamasi epitel

2 : erosi permukaan epitel

3 : ulserasi epitel

c. Organ Ginjal

Organ ginjal dibuat preparat histologi dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x. Diambil 30 glomerulus pada tiap preparat dan diamati kerusakan selnya. Nilai skoring diberikan untuk mengetahui derajat kerusakan yang ditemukan (Leehey dkk, 2008).

Skoring : 0 : glomerulus normal

1 : degenerasi lemak (vakuolisasi)

2 : atrofi glomerulus

3.4. Pengolahan Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan AOT425StatPgm versi 1.0 untuk menentukan estimasi nilai LD₅₀.

